

^{35}S 标记 DNA 探针检测真核单拷贝基因*

陈俊杰 文 一 游乐然 王若菡 张秋萍

(华西医科大学生化教研室, 成都)

提 要

本室采用国产 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP 制备 DNA 探针, 用于检测真核单拷贝基因并初步获得了满意结果。本文还叙述了 ^{35}S 取代 ^{32}P 标记 DNA 探针和 Southern 吸印杂交时, 适宜的反应条件, 优点及其意义。

^{32}P 标记 DNA 探针已在分子生物学领域中得到广泛应用。但是, 由于 ^{32}P 半衰期短 (14.3 天), 加之有的地区交通运输条件限制, 使得国内不少单位开展有关研究诸多不便, 采用 ^{35}S 可在一定程度上解决这一问题。有文献报道 ^{35}S 取代 ^{32}P 标记 DNA 进行菌落杂交、斑点杂交、质粒 DNA 的 Southern 吸印杂交以及

DNA 序列分析^[1-2]。但 ^{35}S 标记 DNA 探针用于检测真核 DNA 的 Southern 吸印杂交尚未见报告。

本文介绍我室采用国产 $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$ dATP 制备 ^{35}S 标记的 DNA 探针, 用于真核 DNA 的 Southern 吸印杂交并获得成功。

* 国家自然科学基金资助项目

讨 论

血清各脂质的含量测定, 对于进一步研讨冠心病以及动脉粥样硬化的发病机理及临床应用都是十分重要的。故血脂含量的测定历来是人们极为关心和致力于研究的课题。现在常用于血脂测定的方法很多, 如各种化学显色法、酶法^[2], 气相色谱法^[3]等都有缺点, 如腐蚀性危害性大, 检测灵敏度差, 准确性不高, 每批酶活力不一致, 操作过程繁复等。关于这一点李健斋曾有关专门的论述^[2]。我们采用硫酸铵硅胶板 TLC 法测定血脂, 一次仅需 0.2ml 血清, 用 CS-910 双波长薄层层析扫描仪外标法定量, 就可准确地同时测得血清中的 FC、CE、TG 以及 TC 的含量, 大大简化了操作步骤, 与其它方法相比, 本法灵敏度高, 专一性强, 用直接参考物作为各血脂成份定量的依据、快速、在同一块板上就可分析 10 个样品, 操作简便。由于我

们是用硫酸铵与硅胶混合在一起直接铺板, 故显色均匀, 稳定性好, 无腐蚀危害性, 数天内斑点基本不褪色。利用 TLC 法测定血清中的 TC 与邻苯二甲醛法比较以及利用 TLC 法测定 TG 与乙酰丙酮法比较, 经 t 检验差别均无显著意义 (P 均 > 0.05)。

TLC 法是一种较经典的方法, 随着硫酸铵硅胶板的使用, 使得许多以前无法直接测定的化合物 (如甾体化合物等) 变成有可能测定。同时也可减少繁琐的操作步骤。本法还可推广到测定其它各种组织中的脂质。

参 考 文 献

- [1] Schlierf, G.: *J. Lipid Res.* 1965, **6**, 317.
- [2] 赵善政等: 《中华医学会上海分会医学检验学会 1982 年度论文选编》, p. 100—108.
- [3] 周国英等: 《生物化学与生物物理学报》1982, **14**, 425
- [4] 李健斋: 《中华医学检验杂志》1982, **5**(1), 36.

[本文于 1987 年 7 月 25 日收到]

材 料 和 方 法

一、试剂和材料 [α - 35 S] dATP (比放射性 600Ci/mmol, 放射性浓度 3 μ Ci/ μ l) (中国科学院上海原子核研究所), 非标记的 dNTP (Sigma), *E. Coli* DNA Polymerase I (华美生物工程公司), 硝酸纤维素膜(浙江黄岩人民化工厂)。其他化学试剂均为国产分析纯级。

二、缺口翻译法制备 DNA 探针 按本室常规方法进行^[3]。取 100 μ Ci [α - 35 S] dATP 于小管内, 真空抽干, 加入 2 μ g 人载脂蛋白 AI cDNA 片段 (pAI101), 20 μ l 5 $\times$ 缺口翻译反应液 (100mmol/L dGTP、100mmol/L dCTP、100mmol/L dTTP、250mmol/L Tris HCl pH 7.5、25mmol/L MgCl₂、0.5mmol/L DTT、500 μ g/ml 牛血清白蛋白), 5U (1 μ l) *E. Coli* Polymerase I, 最终反应总体积为 50 μ l, 于 15 $^{\circ}$ C 反应过夜, 然后加入 2 μ l 0.5mol/L EDTA 终止反应。在上述反应液中加入 50 μ l 1% 兰色葡聚糖, 经过 TE 缓冲液 (10mmol/L Tris-HCl-1mmol/L EDTA, pH8.0) 平衡好的 Sephadex G 50 层析柱 (床体积为 0.8 $\times$ 20cm), 用 TE 缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 每管 0.5ml, 将带蓝色的各管混合, 取 10 μ l 计数。

三、Southern 吸印杂交^[3] 人血白细胞基因组 DNA 样品经限制性内切酶 BamHI、EcoRI 和 Hind III 等消化和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 取出凝胶, 经 0.5mol/L NaOH-1.5mol/L NaCl 变性一小时, 再于 1mol/L Tris-HCl (pH 8.0)-1.5mol/L NaCl 中和 30 分钟两次, 用 10 $\times$ SSC 将凝胶上的酶切片段转移至硝酸纤维素膜上, 再预杂交和杂交, 薄膜经洗脱干燥, 再置于 -70 $^{\circ}$ C 放射自显影 (曝光 4 天)。

结 果 与 讨 论

本实验 [α - 35 S] dATP 掺入 DNA 片段

达 36.9%, 得到较为理想的掺入率^[4]。标记的 DNA 探针比放射强度为 10⁶cpm/ μ g DNA。在缺口翻译反应中, 由于 [α - 35 S] dATP 比 [α - 32 P] dATP 的掺入速度缓慢得多, 因此在使用前者时需要延长聚合反应时间。当反应体系中加入 DNase I (100pg) 时, 由于反应时间延长, 使 DNA 降解成较小片段, 导致标记 DNA 比放射性强度下降 (仅为 1 $\times$ 10⁴cpm/ μ g DNA)。因此, 不加 DNase, 反应过夜可得到较好的标记结果。

35 S 标记人载脂蛋白 AI cDNA 探针与正常人血白细胞基因组 DNA 酶切片段进行分子杂交 (图 1, 见图版 III)。该图显示, 在 BamHI、EcoRI、HindIII 和 Pst I 酶切片段中分别具 13、12、15 和 2.2kb 杂交区带。这一结果与文献报道完全一致^[5]。人载脂蛋白 AI 基因为单拷贝基因^[6]。本实验结果表明, 用 [α - 35 S] dATP 在适当条件下标记 DNA 可获得较高比放的探针, 并有可能检测真核单拷贝基因。与 [α - 32 P] 相比较, [α - 35 S] 的 β 射线较弱, 因此显带较为密集而且清晰, 对邻近杂交带相互干扰小, 操作也较安全; 最大的优点是它的半衰期 (87.1 天) 比 32 P 长 6 倍, 这对于我国有可能开展分子生物学和遗传工程的广阔地区尤为有利。

参 考 文 献

- [1] Radford, A. J.: *Anal. Biochem.*, 1983, 134, 269.
- [2] Biggin, M. D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 3963.
- [3] 刘宗正: 《分子生物学在医学中的应用》北京科学出版社, 1986。
- [4] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, 7th. ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1983.
- [5] Karathanasis, S. K. et al.: *Nature*, 1983, 305, 823.
- [6] Shoulders, C. C. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1982, 10 (16), 4873.

[本文于 1987 年 8 月 3 日收到]

陈蔚梅等:《 ^{35}S - α -dATP 用于缺口转移标记探针 DNA 及蓖麻蚕核型多角体病毒 (ArNPV) 多角体蛋白基因的初步定位》一文的附图 2 图版 III

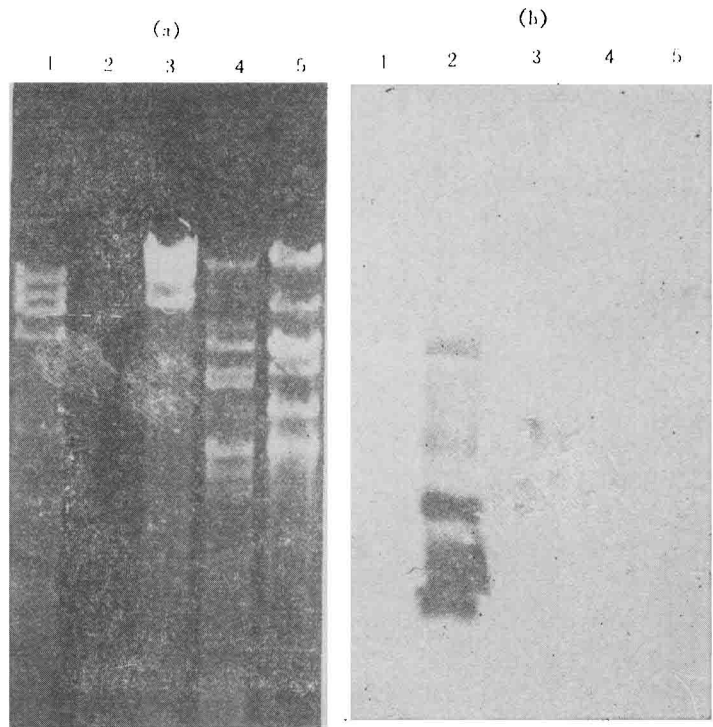


图 2 ArNPV DNA 的限制性内切酶酶切图谱及其与 ^{35}S -pMAVI DNA 的杂交图谱

(a) 酶切图谱

(b) 杂交图谱

1. ArNPV DNA+XhoI; 2. pMAVI DNA; 3. ArNPV DNA+BglII; 4. ArNPV DNA+(BglII+EcoRI); 5. ArNPV DNA+EcoRI

费正等:《一种测定血脂的简便方法——薄层层析法》一文的附图



图 1 硫酸铵硅胶板层析血脂图谱

(1) 磷脂 (PL); (2) 游离胆固醇 (FC); (3) 甘油三酯 (TG); (4) 胆固醇酯 (CE)

陈俊杰等:《 ^{35}S 标记 DNA 探针检测真核单拷贝基因》一文的附图



图 1 人血 DNA 酶解片段与 ^{35}S 标记人载脂蛋白 AI 基因探针杂交的放射自显影图谱

1. Pst I、消化; 2. Hind III 消化; 3. BamHI 消化; 4. EcoRI 消化